

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 5月27日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591238

研究課題名（和文） 好酸球・好塩基球を標的とした慢性そう痒性アレルギー疾患治療と痒みの制御の研究

研究課題名（英文） Approaches for the development of therapeutic tools of chronic pruritic and allergic diseases via targeting against eosinophils and basophils

研究代表者

佐藤 貴浩（SATO TAKAHIRO）

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号：30235361

研究成果の概要（和文）：

皮膚科領域にはいまだ難治性の皮膚疾患が多くみられ患者のQOLを下げている。本研究ではマウスの慢性皮膚炎症および搔破行動モデル、そしてヒトアレルギー性そう痒性疾患における病態解析を通じて、炎症抑制ならびに痒みの解析を行った。その結果、好酸球・好塩基球に発現されているプロスタグランジンD₂ (PGD₂)の受容体の機能の重要性と治療標的として有用性が明らかになるとともに、好塩基球皮膚浸潤抑制のための治療標的候補としてセレクトインも有望であることが示された。

研究成果の概要（英文）：

Itch accompanies various allergic skin diseases. Pruritus greatly impairs the quality of daily life. In this project, mechanisms of chronic allergic inflammations and itch were analyzed with various mouse allergic models where eosinophil and/or basophil infiltration is prominent. Receptors for PGD₂ expressed on eosinophils and basophils were found to be promising therapeutic target for chronic allergic skin inflammations. Selectin-ligand generation in basophils appeared to be a key step for basophil recruitment to the skin, and thus, selectins also could be a potential therapeutic target for basophil-dependent skin diseases.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	1,300,000	0	1,300,000
2012年度	700,000	0	700,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	450,000	3,950,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・皮膚科学

キーワード：皮膚免疫・炎症学

1. 研究開始当初の背景

近年、アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎や蕁麻疹に代表されるいわゆるアレルギー性皮膚疾患の病態の解析が進み、基本的な治療指針も確立されるようになった。しかしいまだ対

症療法が主体であり、従来の治療ではコントロールが困難な難治例も多いのが現状である。また一部の湿疹反応や痒疹などではいまだ病因や発症機序が不明なものも多い。これらの疾患に必ず伴うといってもよい“痒み”

は患者にとって精神的・肉体的苦痛であり生活の質を極端に下げる。しかし“痒み”の研究は大きく遅れていることから臨床上その対応には非常に苦慮する現状にある。

2. 研究の目的

そう痒性アレルギー性皮膚疾患に共通している現象として好酸球浸潤があげられる。好酸球はECP, EDN, MBP, EPOなどの顆粒蛋白を放出し、組織障害をきたす可能性があるほか、各種サイトカイン産生により免疫反応を修飾しうること、組織リモデリングに大きく関与することなどがわかっている。また好酸球由来の顆粒蛋白や他のメディエーターが痒みを引き起こす可能性もいわれている。一方、好塩基球は末梢血のわずか1%程度しか占めないことや、皮膚組織での存在が明確でなかったことからこれまであまり注目されない細胞であった。しかし鳥山らの報告により状況は一変した(Mukai K. et al.: Immunity 23: 191, 2005)。IgE依存性の反応には、即時反応と遅発反応とがあるが、その後超遅発反応(慢性アレルギー性皮膚反応)がみられることがわかり、好塩基球がこの反応のイニシエーターとして極めて重要であることが示された。これをきっかけに、マスト細胞にかかわって好塩基球がアレルギー性炎症の主役として多くの注目をあびるようになってきている。この反応でも結果的に組織好酸球浸潤が誘導される。そしてその特徴的な時間的・組織学的反応様式はアトピー性皮膚炎にみられる一部の病変や抗ヒスタミン薬に抵抗する持続時間の長い蕁麻疹反応、そして痒疹反応などと病態が共通している可能性が高い。

本研究の目的は好酸球・好塩基球の関与を視野にいれ、アレルギー性難治性そう痒性皮膚疾患の病態解明と炎症抑制・痒みの制御を可能にする治療法の開発を試みる。

3. 研究の方法

(1) プロスタグランジン D₂ (Prostaglandin D₂: PGD₂) およびその受容体の機能解析

慢性接触過敏反応や IgE 依存性慢性皮膚炎反応モデルを PGD₂ 受容体である CRTH2 や DP の欠損マウスにおいて誘導し、それぞれの受容体の炎症反応における機能を評価する。

(2) ヒト皮膚疾患における好酸球・好塩基球の解析

アトピー性皮膚炎、接触皮膚炎、治療抵抗性蕁麻疹、難治性痒疹やその他の皮膚疾患における末梢好塩基球 CD203c 発現をフローサイトメトリーで観察しその活性化状態と病勢との相関を解析する。さらに各種皮膚疾患病変部での好塩基球浸潤の有無や程度を観察。また好酸球性のそう痒性疾患である好酸球性膿疱性毛包炎 (Eosinophilic pustular folliculitis: EPF) について、インドメタシンの作用機序を解析する。

(3) 起痒物質による搔破行動と外用薬による抑制効果

ヒスタミン、サブスタンス P, セロトニン、PAR-2 アゴニストなどの起痒物質によるマウス搔破行動に対する外用薬の効果を観察する。

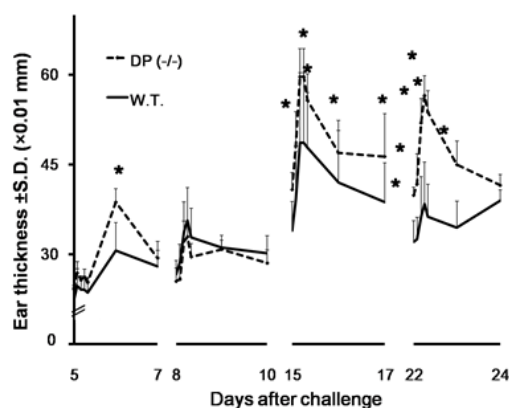
(4) 好塩基球におけるセレクトインリガンド機能解析

セレクトインリガンド機能に必須である修飾酵素 α (1,3) fucosyltransferase (FT)-IV, -VII を欠損させた FT-IV(-/-), FT-VII(-/-), FT-IV(-/-)/-VII(-/-) マウスを用いて IgE 依存性慢性皮膚炎反応を誘導して、セレクトインの重要性を評価する。

4. 研究成果

(1) PGD₂ およびその受容体の機能解析

PGD₂ 受容体欠損マウスを用いて慢性接触過敏反応を観察した。その結果、DP 欠損マウスや DP/CRTH2 両欠損マウスで反応増強がみられ、一方 CRTH2 欠損マウスでの炎症は減弱した。また反応は局所の IL-4, CCL11, CCL22 産生量と相関していた。以上から慢性接触過敏反応において DP シグナルは抑制的に、CRTH2 シグナルは促進的に作用していることがわかった。このことから DP アゴニストおよび CRTH2 アンタゴニストの投与が慢性炎症抑制に有効であると考えられた。



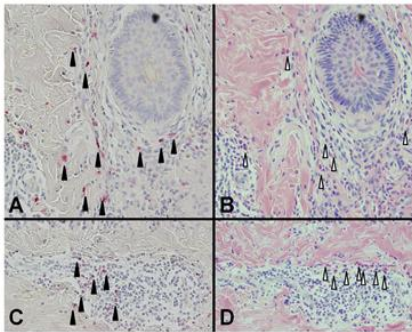
DP (-/-) マウスにおける慢性接触過敏反応の増強

次に PGD₂ 受容体欠損マウスを用いて IgE 依存性慢性アレルギー炎症を観察した。DP の欠損は炎症反応に影響を与えなかった。一方、CRTH2 単独欠損マウスや DP/CRTH2 両欠損マウスでは反応減弱がみられた。これらのマウスでは局所の IL-4, CCL22 産生が低下していた。CRTH2 特異的拮抗薬により IgE 依存性慢性アレルギー炎症は部分的に抑制された。以上から IgE 依存性慢性アレルギー炎症では CRTH2 が部分的に関与しており、CRTH2 拮抗薬が治療薬として有用であると考えられた。今後 PGD₂ 受容体を標的とした慢性そう痒性疾患の治療開発に有用なデータとなった。

(2) ヒト皮膚疾患における好酸球・好塩基球の解析

① ヒト皮膚病変の好塩基球

ヒト皮膚疾患24疾患における皮膚での好塩基球浸潤を解析した。その結果、痒疹、持続時間の長い蕁麻疹、類天疱瘡、好酸球性膿疱性毛包炎 (Eosinophilic pustular folliculitis: EPF)、虫刺症などで多くの好塩基球浸潤が確認された。また痒疹や蕁麻疹患者の末梢好塩基球のCD203c発現は健康人に比べて上昇しており、活性化されていると考えられた。



好酸球性膿疱性毛包炎における好酸球(A, c)と好塩基球(B, D)

② 好塩基球はPGD2を産生する

好塩基球はマスト細胞とその機能が非常に類似している。しかし大きな違いの一つとして好塩基球はPGD2産生しないといわれてきた。今回、マウスおよびヒトの好塩基球を用いて検討したところ、好塩基球は造血器型PGD合成酵素を発現しており、IgEを介した刺激によりPGD2を産生することが明らかになった。

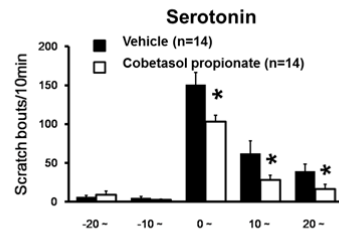
③ インドメタシンがEPFに奏功する機序

次に痒みの強い疾患としてしられるEPFについて検討した。EPFではTh2型サイトカインが優位であり、好酸球浸潤が強くみられる。また上記のように好塩基球浸潤もあることが明らかになっている。EPFではインドメタシンが奏効するが、その機序は明確になってはいない。今回、Th2細胞・好酸球・好塩基球がPGD2の受容体CRTH2を発現していること、そしてインドメタシンがCRTH2のアゴニストであることに注目して、治療効果の機序を解析した。その結果、インドメタシンは好酸球のPGD2に対する遊走を抑制した。さらにエオタキシンに対する遊走も軽度ながら抑制した。またインドメタシン処理により好酸球表面のCRTH2やCCR3発現が減少した。以上からインドメタシンはCRTH2やCCR3の脱感作を起こすことで遊走を抑制し、治療効果を発揮していることが明らかになった。

(3) 起痒物質による搔破行動と外用薬による抑制効果

起痒物質によるマウス搔破行動に対する各種外用薬の治療効果をICRマウスを用いて行った。起痒物質としてヒスタミン、セロトニン、サブスタンスP、PAR-2 agonistを用いた。1

0%クロタミトンはヒスタミン、セロトニン、PAR-2 agonistによる搔破を抑制し、また0.025%カプサイシン軟膏はヒスタミン、サブスタンスP、PAR-2 agonistによる搔破行動を抑制した。またステロイドはいずれの物質による痒みも有効に抑制した。従来から用いられてきた外用薬の止痒効果が今回の基礎的なデータによって裏付けられた。また新たにステロイドが抗非炎作用とは異なった経路で痒みを抑制しうることが判明した。

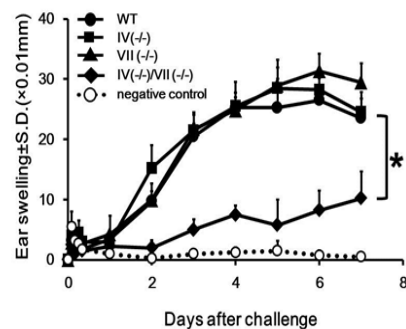


セロトニンによるマウス搔破行動に対するステロイド外用薬の効果

(4) 好塩基球におけるセレクトインリガンド機能解析

IgE誘導性慢性皮膚炎反応をセレクトインリガンド修飾酵素α(1,3)

fucosyltransferases (FT)-IVまたは-VII欠損マウスで誘導した。その結果、FT-IV (-/-)/VII (-/-)マウスではIgE-CAIが完全に消失した。FTの単独欠損マウスではこの現象はみられなかった。さらにFT-IV (-/-)/VII (-/-)マウス由来の好塩基球はFcRγ鎖(-/-)マウスに移入してもIgE-CAIを引き起こすことができず、FT-IV/VIIによって機能調節されるセレクトインリガンドが好塩基球皮膚浸潤およびIgE-CAIの誘導に必須であることがあきらかになった。またその詳細な機序として好塩基球上のPSGL-1とL-セレクトインとの結合が重要なステップとなることが判明した。



各FT欠損マウスにおけるIgE依存性慢性皮膚炎反応

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 23 件)

1. Kataoka N, Satoh T, Hirai A, Saeki K, Yokozeki H. Indomethacin inhibits eosinophil migration to prostaglandin D2: therapeutic potential of CRTH2 desensitization for eosinophilic pustular folliculitis. *Immunology (in press)*. doi: 10.1111/imm.12112.
2. Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. α (1, 3) fucosyltransferases-IV and VII are essential for initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. *J Invest Dermatol (in press)*. doi: 10.1038/jid.2013.160.
3. Kato K, Satoh T, Tanaka-Fujimoto T, Ueda N, Yokozeki H. IgG4-positive cells in skin lesions of cutaneous and systemic plasmacytosis. *Eur J Dermatol* 23: 255-256, 2013. doi: 10.1684/ejd.2013.1962.
4. Inazawa M, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic variant of inflammatory disseminated superficial porokeratosis with lichenoid reaction and extensive amyloid deposition. *Int J Dermatol (in press)*. doi: 10.1111/j.1365-4632.2012.05506.x.
5. Satoh T, Ikeda H, Yokozeki H. Acrosyringeal involvement of palmoplantar lesions of eosinophilic pustular folliculitis. *Acta Derm Venereol* 93: 99, 2013. doi: 10.2340/00015555-1372.
6. Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Close association between metal allergy and nail lichen planus: detection of causative metals in nail lesions. *J Eur Acad Derm Venereol* 27: 231-234, 2013. doi: 10.1111/j.1468-3083.2012.04561.x.
7. Furue M, Ebata T, Ikoma A, Takeuchi S, Kataoka Y, Takamori K, Satoh T, Saeki H, Augustin M, Reich A, Szepietowski J, Fleischer A, Blome C, Phan N-Q, Weisshaar E, Yosipovitch G, Staonder S. Verbalizing extremes of the visual analogue scale for pruritus- a consensus statement. *Acta Derm-Venereol* 93: 214-215, 2013.
8. Tanaka T, Satoh T, Tanaka A, Yokozeki H. Congenital insensitivity to pain with anhidrosis: a case with preserved itch sensation to histamine and partial pain sensation. *Br J Dermatol* 166: 888-891, 2012. doi: 10.1111/j.1365-2133.2011.10706.x.
9. Sekine R, Satoh T, Takaoka A, Saeki K, Yokozeki H. Anti-pruritic effects of topical crotamiton, capsaicin, and a corticosteroid on pruritogen-induced scratching behavior. *Exp Dermatol* 21: 201-204, 2012. doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01433.x.
10. Kanai Y, Satoh T, Yokozeki H. Impaired expression of Tim-3 on Th17 and Th1 cells in psoriasis. *Acta Derm-Venereol* 92: 367-371, 2012. doi: 10.2340/00015555-1285.
11. Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Erythrodermic psoriasis improved by panitumumab. *Acta Derm Venereol* 92: 360-361, 2012. doi: 10.2340/00015555-1348.
12. Igawa K, Satoh T, Yokozeki H. Possible association of Henoch-Schoenlein purpura in adults with odontogenic focal infection. *Int J Dermatol* 50: 277-279, 2011. doi: 10.1111/j.1365-4632.2010.04657.x.
13. Hosoya K, Satoh T, Yamamoto Y, Saeki K, Igawa K, Okano M, Moriya T, Imamura O, Nemoto Y, Yokozeki H. Gene silencing of STAT6 with siRNA ameliorates contact hypersensitivity and allergic rhinitis. *Allergy* 66: 124-131, 2011. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02440.x.
14. Kato K, Satoh T, Nishizawa A, Yokozeki H. Psoriasiform drug eruption due to abatacept. *Acta Derm Venereol* 91: 362-363, 2011. doi: 10.2340/00015555-1042.
15. Satoh T, Ito Y, Miyagishi C, Yokozeki H. Basophils infiltrate skin lesions of eosinophilic pustular folliculitis (Ofuji's disease). *Acta Derm Venereol* 91: 371-372, 2011. doi: 10.2340/00015555-1052.
16. Ito Y, Satoh T, Takayama K, Miyagishi C, Walls AF, Yokozeki H. Basophil recruitment and activation in inflammatory skin diseases. *Allergy* 66: 1107-1113, 2011. doi: 10.1111/j.1398-9995.2011.02570.x.
17. Yamamoto Y, Otani S, Hirai H, Nagata K, Aritake K, Urade Y, Narumiya S, Yokozeki H, Nakamura M, Satoh T. Dual functions of prostaglandin D2 in murine contact hypersensitivity via DP and CRTH2. *Am J Pathol* 179: 302-314, 2011. doi:

10. 1016/j.ajpath.2011.03.047.
18. Ugajin T, Satoh T, Kanamori T, Aritake K, Urade Y, Yokozeki H. Fc ϵ RI, but not Fc γ R, signals induce prostaglandin D2 and E2 production from basophils. *Am J Pathol* 179: 775-782, 2011. doi: 10.1016/j.ajpath.2011.04.023.
 19. Matsushima Y, Satoh T, Yamamoto Y, Nakamura M, Yokozeki H. Distinct roles of prostaglandin D2 receptors in chronic skin inflammation. *Mol Immunol* 49: 304-310, 2011. doi: 10.1016/j.molimm.2011.08.023.
 20. Satoh T, Shimura C, Miyagishi C, Yokozeki H. Indomethacin-induced reduction of CRTH2 in eosinophilic pustular folliculitis (Ofuji's disease): A proposed mechanism of action. *Acta Derm Venereol* 90: 18-22, 2010. doi: 10.2340/00015555-0759.
 21. Shimura C, Satoh T, Igawa K, Aritake K, Urade Y, Nakamura M, Yokozeki H. Dendritic cells express hematopoietic prostaglandin D synthase and function as a source of prostaglandin D2 in the skin. *Am J Pathol* 176: 227-237, 2010. doi: 10.2353/ajpath.2010.090111.
 22. Nishizawa A, Satoh T, Takayama K, Yokozeki H. Hydroa vacciniforme with mucosal involvement and recalcitrant periodontitis and multiple virus re-activation after sun exposure. *Acta Derm Venereol* 90: 498-501, 2010. doi: 10.2340/00015555-0913.
 23. Kato K, Satoh T, Tanaka T, Ueda N, Yokozeki H. Systemic nickel allergy presenting as papuloerythroderma-loke eruptions. *Acta Derm Venereol* 90: 655-656, 2010. doi: 10.2340/00015555-0965.
- [学会発表] (計 12件)
1. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H. Protective roles of STAT6 in basophil-dependent prurigo-like reactions. The 37th Annual Meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Naha, Okinawa, 2012/12/7
 2. Satoh T: Prostaglandin D2 and eosinophilic skin diseases: 22nd World congress of Dermatology, Seoul, 2011/05/28.
 3. Yamamoto Y, Satoh T, Nakamura M, Yokozeki H. Distinct roles of PGD2 receptors in chronic skin inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011/11/27
 4. Takehara Y, Satoh T, Nakamura M, Yokozeki H. Inactivated Sendai virus particles with an IL-2 gene exert anti-tumor effects on murine angiosarcoma. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011/11/29
 5. Saeki K, Satoh T, Yokozeki H. L-selectin ligand synthesis by α (1,3) fucosyltransferases is essential for initial recruitment of basophils and development of chronic allergic inflammation. 第40回日本免疫学会学術集会, 幕張, 2011/11/29
 6. Takehara Y, Satoh T, Nishizawa A, Masuzaya M, Yokozeki H. Inactivated Sendai Virus particles with and IL-2 gene exert anti-tumor effects on murine angiosarcoma. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011/12/9
 7. Nishizawa A, Satoh T, Yokozeki H. Hyperkeratotic type of palmoplantar eczematous reaction: a variant of dyshidrotic eczema? The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011/12/9
 8. Kataoka N, Satoh T, Yokozeki H. Indomethacin-induced inhibition of eosinophil chemotaxis via CRTH2: proposal of a mechanism of action for eosinophilic pustular folliculitis. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011/12/10
 9. Hashimoto T, Satoh T, Yokozeki H. Repeated induction of IgE-mediated chronic allergic skin inflammation induces prurigo-like reaction. The 36th Annual meeting of the Japanese Society for Investigative Dermatology, Kyoto, 2011/12/9
 10. Saeki K, Satoh T, Yokozeki H: Collaborative control of α (1,3) fucosyltransferases-IV and VII for the selectin-dependent initial recruitment of basophils in chronic allergic inflammation. 14th International Congress of Immunology,

Kobe, 24, August, 2010 (Workshop).

11. Yamamoto Y, Satoh T, Otani S, Narumiya S, Nakamura M, Yokozeki H: Deficiency of PGD2 signals enhances contact hypersensitivity via promotion of Th17 and Th1 immunity. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 24, August, 2010 (Workshop).
12. Ugajin T, Satoh T, Kanamori T, Yamamoto Y, Matsushima Y, Yokozeki H: Prostaglandin D2 and E2 production from murine basophils. 14th International Congress of Immunology, Kobe, 24, August, 2010.

[図書] (計 9 件)

1. 佐藤貴浩: アトピー性皮膚炎 今日の小児治療指針 第15版 総編集 大関武彦 古川 漸 横田俊一郎 水口 雅 医学書院 東京 pp777-778, 2012
2. 佐藤貴浩: 好酸球・好中球 1冊でわかる皮膚アレルギー ゲスト編集 塩原哲夫 常任編集 宮地良樹 清水宏 文光堂 東京 pp 29-31, 2012
3. 佐藤貴浩: 結節性痒疹 今日の皮膚疾患治療指針 第4版 編集 塩原哲夫 宮地良樹 渡辺晋一 佐藤伸一 医学書院 東京 pp313-314, 2012
4. 佐藤貴浩: 妊娠性痒疹 今日の皮膚疾患治療指針 第4版 編集 塩原哲夫 宮地良樹 渡辺晋一 佐藤伸一 医学書院 東京 pp315-316, 2012
5. 佐藤貴浩: ウェルズ症候群, 症候群ハンドブック 総編集 井村裕夫 中山書店 東京 pp 509, 2011
6. 佐藤貴浩: E免疫学的検査, 疾病と検査, 看護学テキストNICE, 総編集 松田暉, 荻原俊男, 難波光義, 鈴木久美子, 林直子, 南江堂, 東京, pp257-260, 2010
7. 佐藤貴浩: 5好酸球・好中球, ファーストステップ皮膚免疫学, 編著 戸倉新樹, 中外医学社, 東京, pp44-51, 2010
8. 佐藤貴浩: 7. 抗ヒスタミン薬・抗アレルギー薬, インフォームドコンセントのための図説シリーズ, アトピー性皮膚炎, 改訂版 監修西岡清 片山一朗編, 医薬ジャーナル社, 大阪, pp52-53, 2010.

9. 佐藤貴浩: 金属などの歯科材料によるアレルギーが疑われる患者が来院したら? -その診断と治療方針について-, 医師・歯科医師のための口腔診療必携 (困った時のマニュアルヒント集 202), 監修 高戸 毅 金原出版 東京 pp206, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 貴浩 (SATOH TAKAHIRO)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号 : 30235361